

# La réponse allogénique chez les bovins de l'Ouest africain Modification dans la trypanosomose

par F. FUMOUX, R. QUEVAL, T. TRAORE-LEROUX, I. SIDIBE

Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales (C.R.T.A.)  
B.P. 454, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

## Résumé

FUMOUX (F.), QUEVAL (R.), TRAORE-LEROUX (T.), SIDIBE (I.). La réponse allogénique chez les bovins de l'Ouest africain. Modification dans la trypanosomose. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1984, 37 (N° spécial) : 248-257

Les conditions expérimentales de la réaction allogénique ont été définies pour les taurins de race Baoulé et les Zébus de l'Ouest africain. Bien que de réalisation délicate, elle peut être utilisée pour mettre en évidence une immunosuppression. Lors de trypanosomoses bovines, la réaction allogénique se négative très rapidement. Les mécanismes immunologiques mis en jeu et l'importance de l'immunosuppression sont discutés.

Mots-clés : Trypanosomose - Réaction allogénique - Immunosuppression - Bovins.

## Summary

FUMOUX (F.), QUEVAL (R.), TRAORE-LEROUX (T.), SIDIBE (I.). Allogenic response in West African cattle. Modification in trypanosomiasis. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1984, 37 (N° spécial) : 248-257

Experimental conditions of the allogenic reaction have been defined for taurine cattle of the Baoule breed and for zebus of West Africa. Although the performing of this reaction is rather delicate, it can be used to point out an immunosuppression. During bovine trypanosomiasis the allogenic reaction turns negative very quickly. The immunological process involved and the importance of immunosuppression are discussed.

Key words : Trypanosomiasis - Allogenic reaction - Immunosuppression - Cattle.

## INTRODUCTION

La réponse allogénique est définie comme la réponse immunitaire des lymphocytes d'un individu confrontés avec les lymphocytes d'un autre individu génétiquement différent (3). Elle survient sans immunisation préalable et témoigne d'une disparité pour les structures cellulaires d'histocompatibilité - structures gouvernées chez les bovins par la région BoLA -entre les deux individus.

L'ensemble des phénomènes observés au cours de la réponse allogénique reste incomplètement compris. Celle-ci se traduit par une prolifération lymphocytaire, la génération de lymphocytes cytotoxiques (12), l'apparition de cellules mémoires et suppressives (3).

Seule la prolifération lymphocytaire ou réaction mixte lymphocytaire (RML) a été étudiée en détail chez des taurins Baoulé (Bos taurus) et une population de zébus (Bos indicus) de manière à en préciser les conditions optimales de réalisation. En raison du très grand nombre de facteurs intervenant lors du déroulement de la réaction allogénique, toute modification, même minime, du système immunitaire lors de trypanosomose bovine pourrait s'accompagner d'une modification de cette réponse, traduisant un certain degré d'immunosuppression. L'existence d'une immunosuppression même discrète chez le bétail africain lors de trypanosomoses peut avoir des implications considérables sur l'évolution de la maladie et sur le succès des campagnes de vaccination systématique.

## MATERIEL ET METHODE

### Bovins

Les taurins de race Baoulé et les zébus sont maintenus dans notre ferme expérimentale de Banankélédaga près de Bobo-Dioulasso (République du Burkina), cette zone étant considérée comme indemne de glossines. 213 réactions allogéniques ont été effectuées sur des animaux des 2 sexes non apparentés et âgés de 2 à 5 ans. Aucun de ces animaux ne présentait de signes d'affections cliniques ; l'absence de trypanosomes sanguins a été cependant systématiquement contrôlée.

### Animaux infectés

Neuf animaux (6 taurins et 3 zébus) ont été transférés dans une zone de forte pression glossinienne (région de Samandéni, près de la Volta Noire) et leur réaction allogénique suivie pendant 2 mois. Tous les zébus et 2 Baoulé ont développé une trypanosomose clinique à infestation mixte par T. congolense et T. vivax.

Après prélèvement de sang capillaire dans un tube à microhématocrite et centrifugation, les trypanosomes sont recherchés, au niveau de la zone leucocytaire (7), dans 40 champs consécutifs, au microscope à contraste de phase (grossissement 400).

Enfin, la capacité de réponse vis-à-vis de 14 individus non apparentés a été testée chez 2 zébus présentant une très forte trypanosomose expérimentale à T. congolense.

#### Récolte et isolement des lymphocytes

La méthode utilisée a été déjà précédemment décrite (5). 100 ml de sang veineux sont recueillis aseptiquement à la jugulaire, défibrinés et conservés à basse température, le refroidissement des échantillons devant s'effectuer assez lentement. Après isolement sur Ficoll-Paque (Pharmacia - Fine Chemical), les leucocytes mononucléaires sont repris dans le milieu de culture final (RPMI, 1640) et dénombrés. Les cellules ne sont utilisées que si leur viabilité contrôlée à l'aide de trypan bleu est supérieure à 95 p.100.

L'élimination des cellules adhérentes (essentiellement des monocytes) est réalisée par 3 incubations successives à 37°C, sous 5 p.100 de CO<sub>2</sub> en boîte de Pétri (50 x 13 mm ; Flow).

#### Conditions de culture de la réaction allogénique unidirectionnelle

Le milieu de culture est du RPMI 1640 (Flow Laboratories G.B.) additionné de gentamycine 50 µg/ml, L-glutamine 2 mM, HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane sulfonic acid] 10 mM, 2 mercapto-ethanol 5.10<sup>-5</sup> M et de sérum de veau foetal (5-10 p.100). Dans certaines expériences, le sérum de veau a été remplacé par du sérum autologue inactivé - ou non - à 56°C. Un sérum de veau assurant une bonne prolifération a été sélectionné et utilisé pour toutes les expériences.

La réponse est rendue unidirectionnelle en traitant une population lymphocytaire (devenue "stimulante") par des agents bloquant la division cellulaire ; l'autre population (dite "répondante") est alors seule capable de développer une réponse allogénique (2). 20.10<sup>6</sup> lymphocytes sous un volume de 1 millilitre sont incubés pendant 45 mn en présence de 100 µg de mitomycine C (SERVA). Toutes les 15 mn, une agitation douce est effectuée ; les cellules sont finalement lavées 3 fois dans du RPMI complet et dénombrées.

La réaction proprement dite est réalisée dans des plaques de 96 puits (Linbro, Flow n° 76 00 305). Les lymphocytes stimulants et répondants (5.10<sup>6</sup> cellules/ml) sont répartis sous un volume identique de 100 µl. Les cultures de

contrôle contiennent 0.1 ml de lymphocytes répondeurs et 0.1 ml de ces mêmes lymphocytes traités par la mitomycine. Toutes les déterminations sont effectuées en triple ou quadruple exemplaires.

Les cultures sont maintenues pour la durée choisie (en général 4 jours) à 37°C dans un incubateur Heraeus sous 5 p.100 de CO<sub>2</sub>, puis additionnées de 1 µCi par puits de 5- [125I] Iodo-2'-désoxyuridine (Amersham international pic) pendant 16 heures.

Les cellules ayant incorporé le précurseur radioactif dans leurs acides nucléiques sont récoltées à l'aide d'un collecteur de cellules (Multiple Cell Culture Harvester-Flow Laboratories). Les disques de fibre de verre contenant les cellules marquées sont séchés à la lampe infra-rouge. Le comptage de la radioactivité est réalisé dans un spectromètre à scintillation "Packard 5360 Autogamma".

Les résultats sont exprimés, soit en nombre de coups par minute (CPM) correspondant à la quantité de précurseur de l'ADN incorporé, soit en index de stimulation (IS).

$$IS = \frac{\text{Moyenne des CPM des réactions allogéniques}}{\text{Moyenne des CPM des cultures contrôles}}$$

Une réaction allogénique peut être considérée comme positive lorsque son index de stimulation est supérieur à 2.2. (1).

## RESULTATS

### Réaction mixte lymphocytaire

La réponse allogénique maximale est généralement rencontrée au 4<sup>e</sup> jour de culture, et occasionnellement au 5<sup>e</sup> jour, quelle que soit la concentration cellulaire utilisée (figure n°1). L'index de stimulation le plus élevé est obtenu avec 5.10<sup>5</sup> lymphocytes répondeurs et 5.10<sup>5</sup> lymphocytes stimulants par puits. Une concentration cellulaire plus importante donne aussi de bons résultats, par contre une baisse de la densité cellulaire se caractérise par une forte diminution de la stimulation (tableau N° 1).

L'adjonction au milieu de culture de sérum autologue - préalablement inactivé ou non par la chaleur - à des concentrations de 5 à 10 p.100 s'accompagne d'une diminution de l'index de stimulation surtout importante chez les femelles.

La déplétion du milieu de culture en cellules adhérentes entraîne une inhibition complète de la réponse allogénique (non représenté).

TABL. N°1-Influence de la quantité de cellules sur la réponse allogénique.

	Nombre de Cellules par puits ( $\times 10^{-5}$ )	Jours de culture			
		4	5	6	7
Baoulé 518 stimulé par Zébu 205	7.5	30.0 (1110)	28 (612)	3.2 (517)	ND
	5	36.7 (817)	27 (320)	7.7 (234)	2.7 (250)
	2.5	7.8 (458)	3.5 (270)	2 (244)	3.7 (180)
	1.25	1.9 (482)	2.1 (403)	1.2 (174)	1.4 (358)
Zébu 628 stimulé par Baoulé 467	7.5	17.5 (313)	12.1 (280)	3.2 (294)	ND
	5	23 (287)	11.4 (154)	6.5 (272)	ND
	2.5	6.7 (190)	3.7 (191)	1.2 (597)	ND
	1.25	2.6 (168)	3.4 (137)	2.1 (227)	ND
	0.62	0.8 (608)	1 (309)	1 (436)	ND

Dans tous les cas un nombre identique de lymphocytes stimulants et répondants ont été mis en culture. La réponse allogénique est maximale pour  $5.10^5$  à  $7.10^5$  lymphocytes par puits. Les résultats sont exprimés en index de stimulation, la valeur des contrôles en cpm figure entre parenthèse. ND = non déterminé.

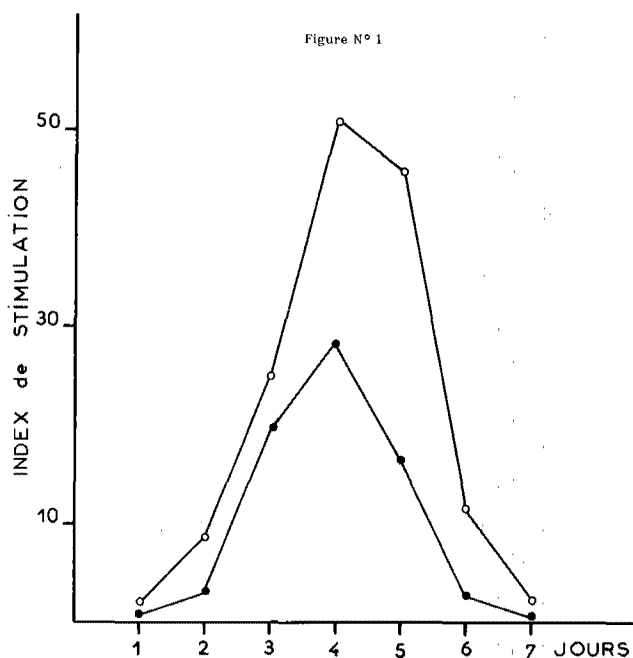


Figure n° 1 : Cinétique de la prolifération lymphocytaire au cours de la réponse allogénique.

○—○ Zébu 633 stimulé par Baoulé 518  
●—● Baoulé 518 stimulé par Zébu 633.

La reproductibilité de la réaction a été étudiée sur 3 couples à un mois d'intervalle ; elle se révèle généralement satisfaisante.

Dans nos troupeaux, les stimulations obtenues s'avèrent en général peu intenses ; il existe un fort pourcentage (48 p.100) de réactions négatives entre

individus non apparentés, tant chez les zébus que chez les taurins (tableau n° II).

TABL. N°II-Réactions allogéniques chez les bovins de l'Ouest africain.

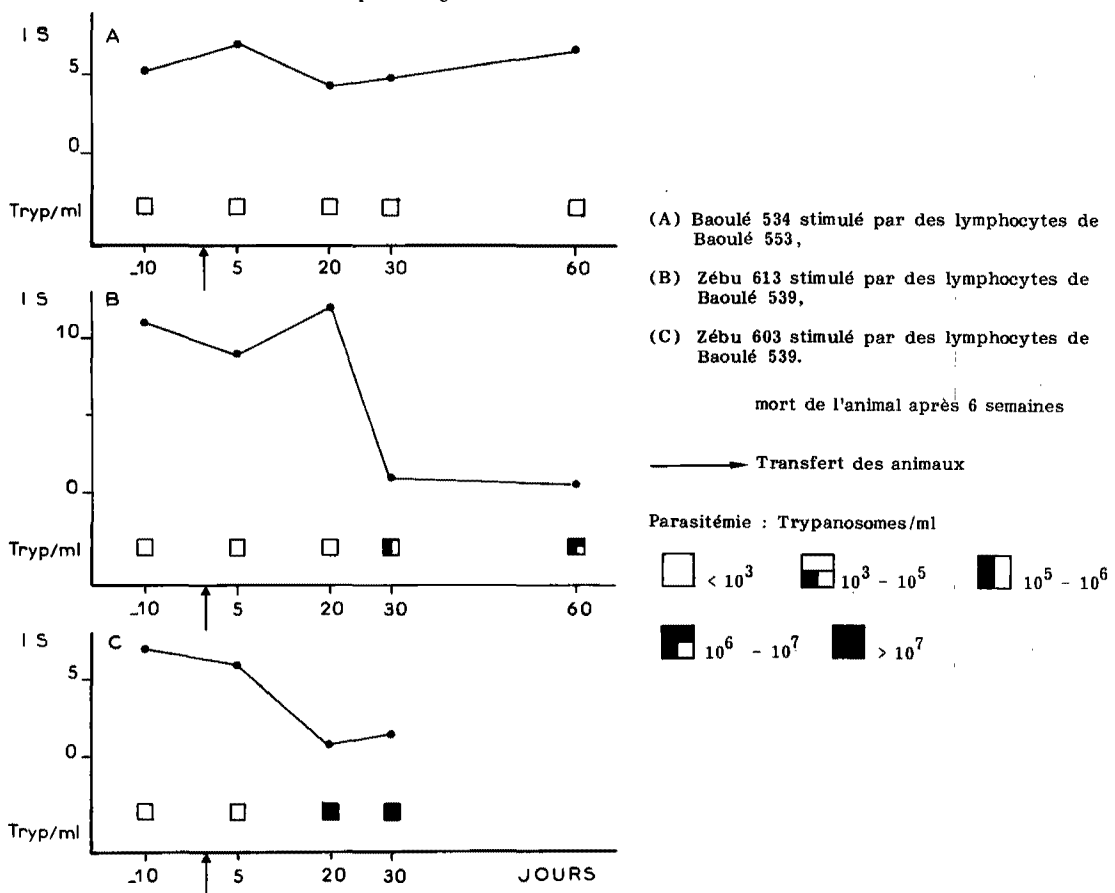
	Nombre de réactions	Réactions positives (p.100)	Index
Zébu x Zébu	41	54	2.2 - 25
Baoulé x Baoulé	36	47	2.2 - 26
Zébu x Baoulé	66	56	2.2 - 59
Baoulé x Zébu	70	51	2.2 - 39

Seules les données correspondant au quatrième jour de culture ont été reportées.

### Suppression lors de trypanosomose

Pour des animaux présentant une infection naturelle mixte à T. congolense et T. vivax, la réponse allogénique est profondément modifiée. Il existe une forte diminution de cette réponse lorsque les animaux présentent une baisse de l'hématocrite (de l'ordre de 10 à 15 p.100) et une parasitémie élevée (figures 2b et 2c) ; cette non réactivité persiste pendant toute la durée de l'infection. Des animaux

Figure n° 2 : Modification de la réponse allogénique chez des animaux transférés en zone de forte pression glossinienne.



maintenus dans les mêmes conditions, mais qui ne développent pas de parasitémie, ne présentent pas de modifications de leur réponse allogénique si les lymphocytes stimulants proviennent d'un individu sain (figure 2a). Par contre, si les lymphocytes stimulants proviennent d'animaux fortement infectés ( $10^6$  -  $10^7$  trypanosomes par ml), il existe une suppression totale de la réponse allogénique (non représenté).

Enfin, 2 zébus présentant une forte infection parasitaire expérimentale à T. congolense (hématocrite à 19 et 21 p.100) n'ont montré aucune réaction allogénique positive vis-à-vis de 14 animaux non apparentés.

## DISCUSSION

La réalisation des cultures mixtes lymphocytaires chez les bovins s'avère beaucoup plus délicate que dans d'autres espèces comme l'homme ou la souris.

Les conditions les plus favorables au développement de cette réaction ont été déterminées pour les bovins de l'Afrique de l'Ouest. La réponse paraît plus précoce que chez les bovins de race européenne (4 jours au lieu de 6 jours). Cependant, à la différence de la plupart des auteurs, nous avons utilisé des lymphocytes mitomycinés et non irradiés (4, 14, 15). Les cellules accessoires (monocytes - macrophages) sont indispensables au bon déroulement de la réaction allogénique ; comme dans la plupart des espèces animales, les lymphocytes bovins nécessitent un signal macrophagique accessoire pour proliférer (6).

L'existence de "facteurs inhibiteurs" de la réaction dans le sérum des femelles gestantes rend difficilement interprétables les réactions mixtes lymphocytaires réalisées en sérum autologue qui ne se révèlent guère reproductibles. Nos résultats diffèrent de ceux de SPLITTER et al. sur le bétail américain (14). Le nombre de réactions allogéniques négatives entre individus non apparentés est considérablement élevé. Certains individus se révèlent "bons répondeurs" sans qu'une explication claire du phénomène puisse être formulée. Ceci a également été trouvé chez les bovins européens (3).

Lors de trypanosomoses, l'immunosuppression est bien caractérisée chez les rongeurs, les primates et l'homme (8,9). Chez les bovins, lors d'infection à T. congolense, la plupart des auteurs se sont attachés à déterminer la production d'anticorps, soit contre des antigènes spécifiques de trypanosomes, soit contre une grande variété d'antigènes vaccinaux. Les résultats sont fortement disparates ; certains notent une suppression importante (11) alors que d'autres n'obtiennent que des différences non significatives (13). Sur nos animaux, l'inhibition de la réponse allogénique semble concomitante de l'infection parasitaire. L'incidence du parasite sur le système immunitaire demeure inconnue mais elle pourrait essentiellement intervenir de deux manières :

- par induction de lymphocytes T suppresseurs, ce qui permettrait d'expliquer la négativité des réactions allogéniques lorsque des individus sains sont stimulés par des lymphocytes d'animaux parasités. Cependant, nous avons précédemment rapporté que la réponse in vitro à diverses lectines demeure normale durant toute la durée de l'infection (5),
- par blocage des cellules accessoires présentant l'antigène ; cette possibilité semble actuellement la plus intéressante.

Dans un modèle murin de la trypanosomose, il a été montré que les lymphocytes spléniques de souris CBA infectées par T. congolense ne sont plus stimulables in vitro par les lectines ou par des lymphocytes allogéniques (8). De plus les lymphocytes de souris infectées sont incapables d'être stimulants dans toute réaction allogénique, du fait que des cellules spléniques suppressives ont été mises en évidence (8).

Un certain degré d'immunosuppression dans les trypanosomoses bovines semble probable : son influence réelle lors des campagnes de prophylaxie nécessiterait une étude plus approfondie.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec le support de l'Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux (I.E.M.V.T.), Maisons-Alfort, France et de la Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (G.T.Z.) Eschborn, République Fédérale d'Allemagne.

Les auteurs remercient le Dr. G.E. ROELANTS pour ses encouragements durant ce travail, MM. T. PALE et B. KAMBIRE pour leur assistance technique.

## Resumen

FUMOUX (F.), QUEVAL (R.), TRAORE-LEROUX (T.), SIDIBE (I.). La respuesta alogénica en los bovinos del Oeste africano. Modificación en la tripanosomiasis. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1984, 37 (N° spécial) : 248-257

Se determinaron las condiciones experimentales de la reacción alogénica para los bovinos (Bos taurus) de raza Baule y los cebues del Oeste africano.

Aunque sea difícil su realización, se puede realizarla para evidenciar una inmunosupresión. Durante tripanosomiasis bovinas, la reacción alogénica se vuelve negativa muy rápidamente. Se discuten de los mecanismos inmunológicos y de la importancia de la inmunosupresión.

Palabras claves : Tripanosomiasis - Reacción alogénica - Inmunosupresión - Bovinos.



## Bibliographie

1. BACH (F.H.), AMOS (D.B.). Hu-1 major histocompatibility locus in man. Science, 1967, 156 : 1506-1508.
2. BACH (F.H.), VOYNOW (N.K.) One way stimulation in mixed leucocytes cultures. Science, 1966, 153 : 545-547.
3. DAUSSET (J.), PLA (M.). Le complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme. Paris, Flammarion, 1985.
4. EMERY (D.), McCULLAGH (P.). Immunological reactivity between chimeric cattle twins. Mixed leukocyte reaction. Transp., 1980, 29 : 17-22.
5. FUMOUX (F.), QUEVAL (R.), TRAORE-LEROUX (T.). Stimulation in vitro des lymphocytes périphériques des bovins de l'Ouest africain par les lectines : intérêt dans la trypanosomose. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1984 37 (N° spécial) : 248-257
6. MASTRO (A.M.), SNIEZEK (M.J.). The effect of removal of adherent cells in lectin and allogenic cell stimulation of bovine lymphocytes. Vet. Immunol. Immunopath., 1984, 5 : 161-176.
7. MURRAY (M.), MURRAY (P.K.), McINTYRE (W.I.M.). An improved parasitological technique for the diagnosis of african trypanosomiasis. Trans. r. Soc. trop. Med. Hyg., 1977, 71 : 271-286.
8. ROELANTS (G.E.), PEARSON (T.W.), TYRER (H.W.), MAYOR-WITHEY (K.S.), LUNDIN (L.B.). Immune depression in trypanosome infected mice. II. Characterization of the spleen cells involved. Eur. J. Immunol., 1979, 9 : 195-199.
9. ROELANTS (G.E.), PINDER (M.). The immunobiology of african trypanosomiasis. Contemp. Topic in Immunobiol, 1984, 12 : 225-274.
10. ROELANTS (G.E.), WILLIAMS (R.O.). African trypanosomiasis. Critical Reviews in trop. Med., 1982, 1 : 31-75.
11. RURANGIRWA(F.R.), TABEL (H.), LOSOS (G.J.), TIZARD (I.R.). Suppression of antibody response to Leptospira biflexa and Brucella abortus and recovery from immunosuppression after Berenil treatment. Infect. Immun., 1970, 26 : 822-826.
12. SOLLIDAY (S.), BACH (F.H.). Cytotoxicity : specificity after in vitro sensibilisation. Science, 1979, 170 : 1406-1409.

13. SOLLOD (A.E.), FRANCK (G.H.), Bovine trypanosomiasis effect on the immune response of the infected host. Am J. vet. Res., 1979, 40 : 658-664.
14. SPLITTER (G.A.), EVERLITH (K.M.), USINGER (W.R.). Bovine mixed leukocyte response : effect of selected parameters on cell responses. Vet. Immunol. Immunopath., 1981, 2 : 215-232.
15. SPOONER (R.L.), LEVEZIEL (H.), GROSCLAUDE (F.), OLIVER (R.A.), VAIMAN (M.). Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle. J. Immunogen., 1978, 5 : 335-346.